

GRAU UNIVERSITARI EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

TREBALL DE FI DE GRAU:

HYDROGELS FOR OPHTHALMIC DRUG DELIVERY

BERNAT MÖSSINGER SANAHUJA

TZANKO TZANOV

ESTER GUAUS GUERRERO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

13 de gener de 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2019. Tots els drets reservats

GRAU UNIVERSITARI EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

Els Srs. Tzanko Tzanov i Ester Guaus Guerrero, com a tutor i director del treball,

CERTIFIQUEN

Que el Sr. Bernat MössingerSanahuja ha realitzat sota la seva supervisió el treball "HYDROGELS FOR OPHTHALMIC DRUG DELIVERY" que es recull en aquesta memòria per optar al títol de grau universitari en Òptica i Optometria.

I per a què consti, signo/em aquest certificat.

Sr Tzanko Tzanov
Director/a del TFM

Sra Ester Guaus Guerrero
Director/a del TFM

13 de gener de 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2019. Tots els drets reservats

GRAU UNIVERSITARI EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

Resum

La baixa penetració dels fàrmacs dins de l'ull, causada per les seves barreres morfològiques i per la ràpida excreció dels mateixos a través de l'aparell lacrimal, és necessari trobar una altra manera de instil·lar fàrmacs tòpics a l'ull. Una opció que ha estat considerada per al subministrament de fàrmacs per via tòpica són els hidrogels.

En aquest projecte s'ha sintetitzat un hidrogel compost per un polímer: Àcid hialurònic modificat, que s'entrellaça mitjançant una reacció enzimàtica amb compostos fenòlics naturals.

Per una banda es fa servir un biopolímer amb propietats adequades per un hidrogel per aplicació tòpica com poden ser la seva biocompatibilitat i la lubricació.

Per l'altra banda s'han emprat també compostos fenòlics que aporten un caràcter antioxidant.

La síntesi del hidrogel per aquest projecte, s'ha dut a l'enzim lacasa per generar els enllaços covalents que donen lloc al hidrogel. L'ús d'un enzim permet una reacció controlada i, en condicions suaus, actua com a catalitzador biològic d'elevada especificitat.

En aquestes condicions la lacasa, utilitzant l'oxigen del medi i generant aigua com a producte de reacció, oxida els compostos fenòlics que després reaccionen amb els tiols del HA per generar el hidrogel. Aquestes condicions fan que els hidrogels sintetitzats siguin possibles plataformes d'encapsulació i alliberament de fàrmacs.

13 de gener de 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2019. Tots els drets reservats

GRAU UNIVERSITARI EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

Resumen

La baja penetración de los fármacos dentro del ojo, causada por sus barreras morfológicas y por la rápida excreción de los mismos a través del aparato lagrimal, es necesario encontrar otra manera de instilar fármacos tópicos en el ojo. Una opción que ha sido considerada para el suministro de fármacos por vía tópica son los hidrogeles.

En este proyecto se ha sintetizado un hidrogel compuesto por un polímero: Ácido hialurónico modificado, que se entrelaza mediante una reacción enzimática con compuestos fenólicos naturales.

Por un lado se utiliza un biopolímero con propiedades adecuadas para un hidrogel para aplicación tópica como pueden ser su biocompatibilidad y la lubricación.

Por otro lado se han empleado también compuestos fenólicos que aportan un carácter antioxidante.

La síntesis del hidrogel para este proyecto, se ha llevado a la enzima lacasa para generar los enlaces covalentes que dan lugar al hidrogel. El uso de una enzima permite una reacción controlada y, en condiciones suaves, actúa como catalizador biológico de elevada especificidad.

En estas condiciones la lacasa, utilizando el oxígeno del medio y generando agua como producto de reacción, oxida los compuestos fenólicos que después reaccionan con los tioles del HA para generar el hidrogel. Estas condiciones hacen que los hidrogeles sintetizados sean posibles plataformas de encapsulación y liberación de fármacos.

13 de gener de 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2019. Tots els drets reservats

GRAU UNIVERSITARI EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

Abstract

Due to the low penetration of drugs into the eye due to their morphological barriers and their rapid excretion through the lacrimal apparatus, it is necessary to find another way to instill topical drugs into the eye. One option that has been considered for topical drug delivery is hydrogels.

This project synthesized a hydrogel composed of a polymer: Modified hyaluronic acid, which is interlaced by an enzymatic reaction with natural phenolic compounds. On the one hand, a biopolymer with suitable properties for a topical application of a hydrogel is used, such as their biocompatibility and lubrication.

On the other hand, phenolic compounds that have an antioxidant nature have also been used.

The synthesis of the hydrogel for this project was carried out by the enzyme laccase to generate the covalent bonds that give rise to the hydrogel. The use of an enzyme allows for a controlled reaction and, under mild conditions, acts as a highly specific biological catalyst.

Under these conditions, the laccase, using the oxygen in the medium and generating water as a reaction product, oxidizes the phenolic compounds which then react with the HA thiols to generate the hydrogel. These conditions make the synthesized hydrogels possible drug encapsulation and release platforms.

13 de gener de 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2019. Tots els drets reservats

Agraïments

Als directors del projecte Tzanko Tzanov i Ester Gaus, per haver-me orientat en la realització d'aquest projecte i ajudar-me en qualsevol moment que els he necessitat.

A la Sílvia Pérez i Guillem Ferreres, per la seva paciència, la seva ajuda en tot moment i per tot el que he après al llarg d'aquest any. Sense ells, no hauria pogut desenvolupar aquest projecte.

Al meu pare, mare i germà el suport el qual ha estat crucial durant l'any passat, ja que va ser un any ple d'esdeveniments inesperats. Amb la seva ajuda i motivació, vaig tenir la força per continuar.

Als meus amics de la infància per haver estat al meu costat en moments de dubte i desesperació. Sempre estareu al meu cor.

I per últim, però no per això menys important, gràcies a l'Alba González Artés. Ets una de les persones més importants de la meua vida. Tu em vas animar i em vas ajudar a avançar en els moments més difícils.

A tots vosaltres us dec el meu agraïment. Gràcies.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	9
a. Àcid Hialurònic	11
b. Compostos fenòlics	12
 2. OBJECTIUS	 13
 3. MATERIALS I MÈTODES	 14
a. Modificació de l'àcid hialurònic	14
i. Síntesi de HA-ADH: Aminació	14
ii. Caracterització de grups Amino:Mètode TNBSA	16
iii. Síntesi de HA-SH: Tiolització	18
iv. Caracterització de grups tiol: Procediment Ellman	19
v. Caracterització de grups disulfur: Amb reactiu d'Ellman.	21
b. Síntesi de hidrogels	22
i. Preparació dels àcids hialurònics	22
ii. Preparació de la lacasa	23
iii. Preparació dels compostos fenòlics	24
iv. Formació d'hidrogels amb compostos fenòlics	25
v. Resultats dels hidrogels amb compostos fenòlics	25
c. Caracterització de hidrogels amb compostos fenòlics	26
i. Control d'oxidació del medi: DPPH	26
ii. Control de la degradació del polímer	27
iii. Control del creixement de microorganismes	29
iv. Viabilitat cel·lular	30

4. Resultats i discussió	32
a. Avaluació de grups amino: Mètode TNBSA	32
b. Avaluació de grups tiol: Procediment Ellman	33
c. Avaluació de grups disulfur: Amb el reactiu d'Ellman	33
d. Resultats dels hidrogels amb compostos fenòlics	34
e. Caracterització de hidrogels amb compostos fenòlics	34
i. Activitat antioxidant dels hidrogels: Assaig de DPPH	36
ii. Control de la degradació del polímer	37
iii. Control del creixement de microorganismes	37
iv. Viabilitat cel·lular	39
5. Conclusions	41
6. Bibliografia	43

1. Introducció

Un gel és constituït per una xarxa tridimensional de cadenes flexibles formades per segments connectats d'una determinada manera i inflada per un líquid. Si el líquid que penetra entre les cadenes és orgànic, es dona el nom de organogel; en canvi si el líquid és aigua, el gel rep el nom d'hidrogel.

Els gels es poden classificar en dos grups diferents determinats per la unió que hi ha entre els monòmers de la xarxa tridimensional. Els gels físics són aquells que formen part de la xarxa tridimensional a través d'enllaços que no són totalment estables, sinó que mantenen una reacció contínua d'enllaç \Leftrightarrow no enllaç que es pot produir en els dos sentits.¹

Normalment les unions d'aquests tipus de gels són gràcies a les forces de Van der Waals. Per l'altra banda hi ha els gels químics, que són aquells, els enllaços dels quals són covalents, un tipus d'unió més forta que un cop es trenca produeix la degradació del polímer. Per aquest motiu, els gels químics no són reversibles amb la temperatura, és a dir, un cop trencades les seves unions no es poden tornar a formar. D'aquesta manera es poden diferenciar també com a gels entrecreuats i no entrecreuats, i la seva diferència principal es troba en l'exposició als lípids, els quals poden penetrar i quedar retinguts entre les cadenes ja que les unions entre elles són dèbils (gel físic), mentre que en els gels entrecreuats o químics l'entrada dels lípids no és possible i queden a la superfície.

Els hidrogels són polímers amb diverses característiques pròpies. Són hidròfils, insolubles en aigua, tous, elàstics i en presència d'aigua, augmenten el seu volum considerablement però mantenint la seva forma fins a arribar a un equilibri físico-químic, mentre que en estat deshidratat (anomenat xerogel) són cristal·lins¹

Els hidrogels van començar a desenvolupar-se a l'any 1960, a través del treball de Wichterle y Limm, sobre les aplicacions del poli (metacrilat de 2-hidroxietil) (PHEMA) i els seus derivats en possibles usos biomèdics.

Les característiques que tenen els hidrogels és gràcies a la seva estructura molecular i a alguns dels seus radicals. Per exemple, la seva capacitat hidrofílica és deguda a la presència d'alguns grups funcionals hidrofílics (OH, COOH, CONH₂, CONH, SO₃H, etc.). La seva insolubilitat és deguda a l'entrecreuament dels segments que formen una xarxa tridimensional. Per altra banda, el tacte suau i la seva flexibilitat són

possibles gràcies a un monòmer hidrofílic inicial i a una baixa densitat de la xarxa polimèrica que el forma.

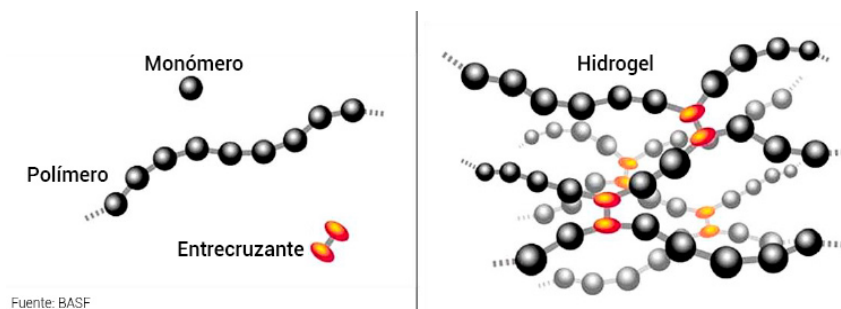


Figura 1.1: Esquema on es presenten les parts d'un hidrogel individualment, i el conjunt de totes elles formant una xarxa tridimensional.

Els hidrogels tenen diverses aplicacions actualment, des d'aplicacions terapèutiques pel tractament de ferides cròniques, com a mètode antibacterià amb nanopartícules i també en la formació de lents de contacte ja que tenen la capacitat de mantenir la seva forma en medis aquosos com la llàgrima.

Les ferides que no mostres signes de curació passades de 3 a 6 setmanes, es consideren ferides cròniques. Aquestes tenen un tractament que en molts casos és costós en recursos i és poc efectiu. Tot i que l'origen i característiques clíniques no són sempre comuns entre les ferides cròniques, aquestes comparteixen característiques com la contaminació de diverses espècies bacterianes com la *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) i les matrius metàl·liques-loproteïnases (MMP) entre d'altres. Un dels possibles tractaments d'aquestes ferides són els apòsits crònics, tenen com a objectiu absorbir els exsudats de la ferida i mantenir-la humida.

2

En aquest projecte es realitzaran diverses tasques relacionades amb els hidrogels, la preparació dels reactius, la modificació de l'àcid hialurònic, la síntesi de l'hidrogel així com la combinació d'aquest amb diversos compostos fenòlics i caracteritzar les seves propietats i valorar si aquests produeixen canvis en les propietats de l'hidrogel. Per tant cal explicar què són alguns dels materials que es fan servir en aquest projecte. En primer lloc, cal parlar de l'àcid hialurònic, que és el material que es necessita de base per la producció d'hidrogels.

a. Àcid hialurònic

L'àcid hialurònic és un polisacàrid natural que pertany al grup dels glicosaminoglicans compost per grups de disacàrids d'àcid D-glucurònic i N-acetil-D-glucosamina units per enllaços beta.

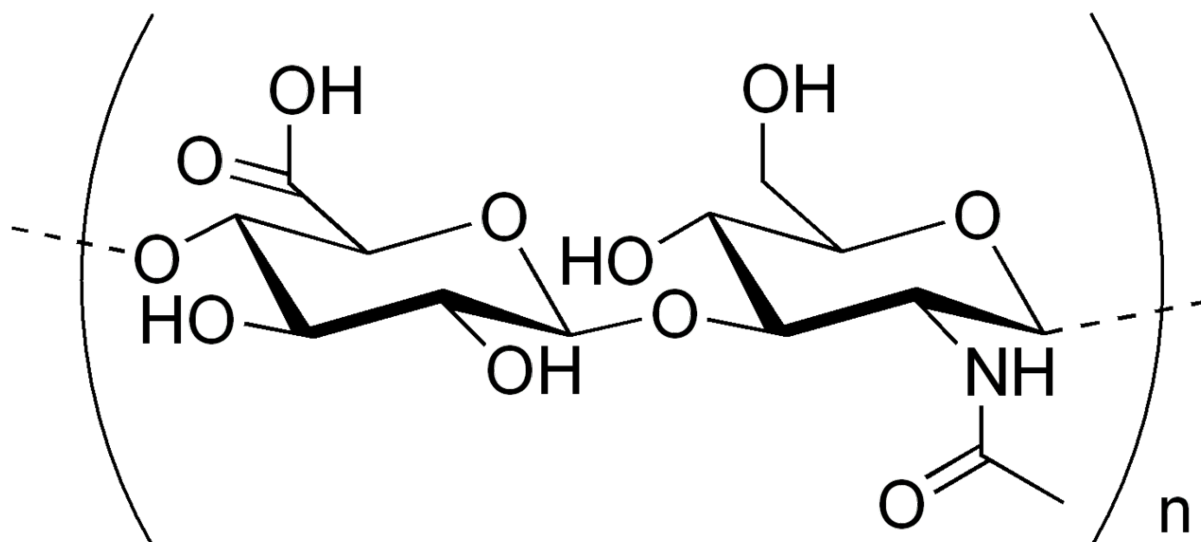


Figura 1.2: Estructura molecular de l'àcid hialurònic.

És produït principalment per cèl·lules mesenquimals principalment i es pot formar en altres cèl·lules. Es troba de manera abundant en el cos humà, en diversos teixits i fluïts de l'organisme com poden ser la pell, l'humor vitri, el líquid sinovial, el teixit ossi i en diversos dels òrgans vitals de l'organisme. En el cos d'un ésser humà mig de 70 Kg pot contenir uns 15 grams d'àcid hialurònic dels quals, un terç es renova degradant-se i sintetitzant-se diàriament.³

L'àcid hialurònic té diferents propietats fisicoquímiques que poden ser útils per una aplicació en la cirurgia oftalmològica degut a les seves propietats viscoelàstiques.

Aquestes propietats són de gran ajuda en cirurgies oftàlmiques com la intervenció de les cataractes per protegir l'endoteli corneal, de la mateixa manera, aquest polisacàrid és beneficiós en altres intervencions com la queratoplàstia penetrant, trabeculectomia, reaparellament de la retina i cirurgia de trauma, tot i que l'avantatge que suposa l'àcid hialurònic en aquestes intervencions, està recolzada per menys literatura publicada.

Algunes de les seves altres propietats com poden ser la lubricant, la amortidora i inclús alguna propietat antiinflamatòria, són el motiu pel qual no es descarta la investigació

o recerca de l'àcid hialurònic per al tractament de malalties com l'artrosi o fins i tot, en menor mesura, de l'artritis reumatoide.

A més, la tolerabilitat que té l'àcid hialurònic en concentració de l'1% és molt bona, sobretot en les intervencions esmentades anteriorment, de la mateixa manera que també ha donat bons resultats en pacients amb artrosi a través d'injeccions intraarticulars.⁴

L'àcid hialurònic té també aplicacions en lubricants oculars ja que té un comportament no newtonià. Aquesta propietat fa que durant el parpelleig les molècules d'àcid hialurònic es disposin en paral·lel a causa de les forces de cisallament, fet que redueix el coeficient de fricció que existeix en els casos d'ull sec reduïnt també la incomoditat del pacient. A més, l'àcid hialurònic té una gran capacitat d'adhesió als epitelis, produint una estanquitat que allarga el temps de permanència del lubricant respecte a lubricants amb característiques newtonianes.³

b. Compostos fenòlics

Els compostos fenòlics són aquells que contenen en la seva estructura un o més grups fenòlics o anells aromàtics units a un hidroxil. Aquests compostos són orgànics i provenen d'algunes plantes superiors de les quals en són metabòlits secundaris de les plantes, que es produeixen principalment a través de dues vies: La ruta de l'àcid shikímic i la via de l'àcid manòlic. Per aquest motiu, els compostos fenòlics estan considerats metabòlics heterogenis.^{5 6}

Els compostos fenòlics estan relacionats amb la defensa contra la radiació ultraviolada o l'agressió de patògens.⁷

S'han descrit milers de tipus diferents de compostos fenòlics que es poden agrupar en diferents classes segons la seva estructura química bàsica com el tipus i nombre d'anells de fenol.⁸

Aquests compostos són importants per la realització d'aquest projecte ja que aporten un caràcter antioxidant a més de tenir una capacitat inhibidora pel desenvolupament de possibles patògens que es puguin trobar en una ferida crònica.

2. Objectius

a. Objectiu principal:

- Síntesi enzimàtica d'un hidrogel a partir del biopolímer àcid hialurònic i compostos fenòlics naturals com a plataforma per aplicacions oftalmològiques.
- Producció d'una plataforma per l'alliberament de fàrmacs.

b. Objectius secundaris

- Modificació i caracterització de l'àcid hialurònic per obtenir un polímer amb els grup funcional tiol que participarà en la reacció de formació del hidrogel.
- Preparació de diferents hidrogels a partir del polímer modificat amb diversos compostos fenòlics naturals a través de l'acció de l'enzim lacasa.
- Estudi de les propietats d'aquests hidrogels en termes de degradació, capacitat antioxidant i biocompatibilitat.

3. Materials i mètodes

a. Modificació de l'àcid hialurònic

L'àcid hialurònic que utilitzarem serà modificat en dos processos, en el primer cas modificarem l'àcid hialurònic (60mg) amb ADH (1.1g) fent una aminació. En segon lloc, es farà la tiolació de l'àcid hialurònic amb el reactiu de Traut.

i. Síntesi de HA-ADH: Aminació

Per fer la modificació de l'àcid hialurònic, cal fer la aminació afegint àcid adípic dihidràcid (ADH). Per a fer aquesta modificació caldrà comptar amb àcid hialurònic (HA) amb un pes molecular de 200 kDa, el qual el dissoldrem en una concentració de 5 mil·ligrams per cada mil·lilitre d'aigua MilliQ, per tant, pesarem 60 mil·ligrams d'àcid hialurònic (HA) en 12 mil·lilitres d'aigua MilliQ, i ho barrejarem fins que estigui totalment dissolt. Posteriorment afegirem 1,1g d'adipic dihidràcid (amb una relació molar 1:40, HA:ADH) en estat sòlid (ADH) i es mesclarà tot durant 30 minuts mentre que amb l'ajuda d'un pH metre i àcid clorhídric (HCl), mantindrem el pH de la reacció en un valor de 4,8. Un cop passats aquests 30 minuts, afegirem 0,1 grams de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida clorhidrat (EDC) relació molar 1:4, HA:EDC, deixarem la solució en agitació durant dues hores mentre es continua mantenint el pH a 4,8 ajustant-ho amb HCl.

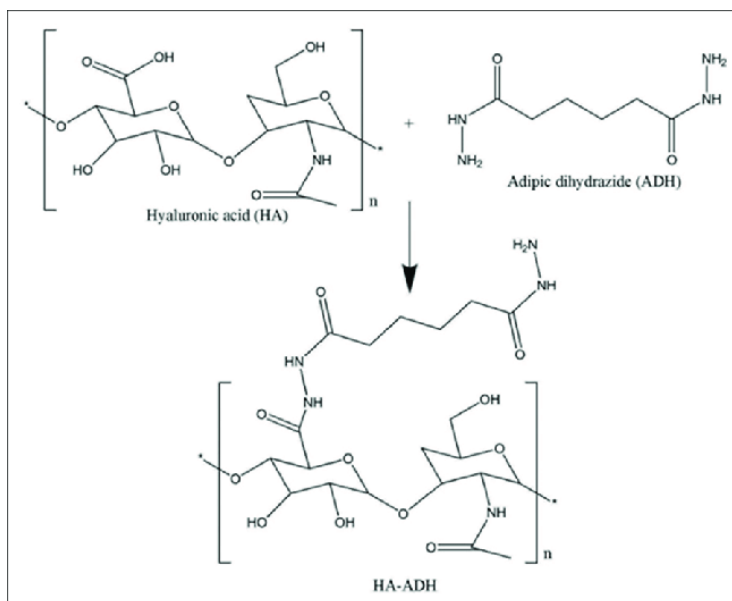


Figura 3.1: Esquema molecular de la modificació de l'àcid hialurònic amb ADH

Arribats a aquest punt, es posarà el producte final dins de membranes orgàniques i es deixarà fent diàlisi durant tot un dia canviant el medi de diàlisi tres vegades. Un cop dialitzat, l'HA modificat es congelarà a -80 graus i s'eliminarà l'aigua resultat mitjançant el procés de liofilització.⁹

Tenint en compte que en la modificació de l'ADH sobre l' HA es produeix com a resultat un polímer amb una cadena alifàtica acabada amb grups amino ($-NH_2$), podem saber quina quantitat d'ADH ha reaccionat amb l'HA a través de la quantificació dels radicals del polímer que continguin un grup amino, de manera que hem de seguir un protocol de determinació dels grups amino.

ii. Caracterització dels grup Amino: Mètode TNBSA

En primer lloc cal preparar una solució tampó de bicarbonat 0.1M i amb pH 8.5 seguint la pauta següent: Per cada 100 ml d'aigua milliq cal afegir-hi 0.8401grams de bicarbonat de sodi (Na_2CO_3). En el meu cas, vam posar 0.8402 g de Na_2CO_3 i el pH final va resultar en 8.49. Un cop preparada la dissolució tampó de bicarbonat, procedim a preparar una solució que farem servir de patró per aconseguir una recta de calibrat i quantificar els grups amino lliures. Per a preparar la dissolució patró es necessiten 0.0065g d'ADH per cada mililitre de dissolució tampó de bicarbonat pH 8.5. Posteriorment prepararem unes mostres d'HA i d'ADH de diferents pesos molecular per tenir-les en compte en comparació a la recta de calibrat i al resultat de l'absorbància un cop es faci la lectura.

El procés serà el següent: utilitzarem una placa greiner ja que la lectura es donarà a una longitud d'una de 335nm, per tant la lectura es dona fora de l'espectre electromagnètic visible.



Figura 3.2: Placa Greiner

Aleshores posarem al pou A1 200 μl de solució ADH i des del pou A2 fins al pou B12 posarem 100 μl de solució tampó de bicarbonat pH 8.5. Aleshores, agafarem 100 μl d'ADH del pou A1 i els posarem al pou A2 per baixar la concentració d'ADH, després agafarem 100 μl del pou A2 i els posarem al pou A3 i repetirem aquesta acció per cada pou fins arribar al pou B9, de manera que en cada pas de pou a pou hi haurà una reducció de la concentració d'ADH de la meitat. Finalment al pou B9 li treurem un volum de 100 μl per aconseguir que tots els pous continguin un volum de 100 μl de solució. els pous del B10 al B12 es faran servir de control, i els pous del C1 al C6 s'ompliran amb mostres d'HA i d'HA-ADH.

El següent pas serà afegir 50 μl de TNBSA, el qual es prepara barrejant 10 μl de TNBSA en 5ml de tampó bicarbonat. Un cop afeït l'indicador, deixarem la placa en una incubadora a 37°C durant dues hores. Passat aquest temps, s'hauria de poder observar un canvi de color en les mostres, sobretot en aquelles que contenen una concentració d'ADH més alta.

Arribats a aquest punt, afegirem 50 μl de dodecilsulfat sòdic (SDS) a cada pou i després afegir també 25 μl d'àcid clorhídric normal (1N HCl). En aquest punt podem

procedir a fer la lectura de la placa a 335nm obtenint una recta de calibrat. Un cop obtinguts els valors d'absorvència, podem determinar l'equació de la recta amb una pendent determinada.

Taula 3.1: Taula de pes i concentració de les mostres a analitzar en la caracterització dels grups amino

MOSTRA	CARACTERÍSTIQUES	PES	VOLUM dio	CONCENTRACIÓ
Tampó fosfat	NaHPO4 dissolt en milliq	6.6150g	500ml	1.323%
	NaH2PO4 dissolt en milliq	0.5392g	500ml	0.10784%
HA-SH (3%)	Mostra a avaluar	0.0063g	200 µl	3.15%
HA-SH (1.5%)	Mostra a avaluar	0.0036g	200 µl	1.80%
HA (3%)	Mostra a avaluar	0.0064g	200 µl	3.2%
HA (1.5%)	Mostra a avaluar	0.0033g	200 µl	1.65%

iii. Síntesi de l'HA-SH: Tiolització

Un cop establert que és possible modificar l'àcid hialurònic amb l'ADH, podem tornar a modificar l'àcid hialurònic, però aquest cop, es modificarà amb grups tiol.

Per poder preparar l'àcid hialurònic combinat amb un grup tiol, necessitarem en primer lloc àcid hialurònic que hagi reaccionat amb ADH (HA-ADH). N'agafarem 100 mg i els barrejarem en 4.5 ml d'aigua millig, i ho deixarem mesclar durant una hora. Posteriorment prepararem una dissolució fosfat,

la qual produïrem barrejant NaHPO₄ i NaH₂PO₄ en aigua millig i després s'ajusta el pH. Un cop la solució tampó fosfat està preparada, hem d'afegir el reactiu de Traut i afegir l'HA-ADH dissolt que hem fet en el pas anterior, i barrejar durant dues hores. Un cop passat aquest temps, hem de precipitar el resultat amb etanol i posteriorment netejar les

mostres tres vegades per obtenir una mostra resultant el més pura possible. Arribats a aquest punt, l'HA-SH ja està preparat.⁹



Figura 3.3: Àcid hialurònic modificat amb grups tiol

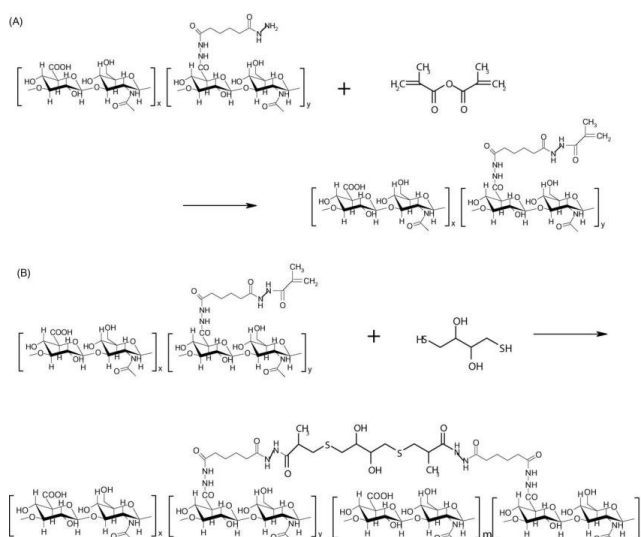


Figura 3.4: Esquema molecular de la tiolització.

iv. Caracterització de grups tiol: Procediment Ellman

En primer lloc caldrà preparar mostres de diferents pesos moleculars de l'HA i de l'HA-SH. Un cop les tinguem preparades, cal també preparar el patró de calibrat el qual s'elabora amb L-cysteine en el qual reacciona el grup tiol, aquest patró es prepara seguint la proporció de 0.018 g/ml, en aquest cas, calia preparar 5 ml i per tant el càlcul era de 5×0.018 , el resultat del qual era de 0.09 g de L-cysteine; el valor pesat va ser de 0.0911 g. Acte seguit preparem el reactiu d'Ellman (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic) acid) el qual ha de seguir la pauta de 3 mg/ml, fent el càlcul ens dona que hem de pesar 6 mg del reactiu d'Ellman per poder fer-ne 20 ml, el pes real va ser de 6.3 mg. Un cop tenim tots els reactius procedim a preparar el patró de L-cysteine. Farem servir una placa Elisa, que té transmitància de 412 nm a 450 nm que formen part de l'espectre visible.

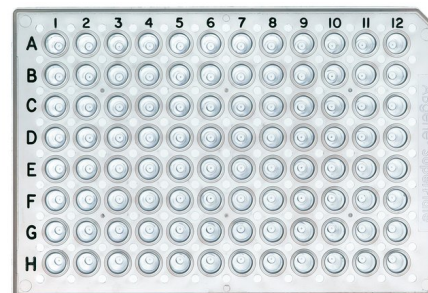


Figura 3.5: Fotografia d'una placa Elisa

En primer lloc posarem 100 µl de tampó fosfat en cada pou, des de l'A1 fins al B12, posteriorment posarem 100 µl més de L-cysteine al pou A1, i després agafarem 100 µl del pou A1 i els posarem al pou A2, i així successivament fins a arribar al pou B9; del pou B10 al B12 els deixarem de mostres control. Per últim, posarem 100µl més de reactiu d'Ellman a cada pou; hauriem de poder observar un canvi de color instantani sobretot en els primers pous, on hi ha més concentració de L-cysteine; i podem posar la placa al lector d'absorbància. Amb els resultats que ens doni aquesta lectura podrem fer un patró de pendent dins la corba d'absorbància.

Taula 3.2: Taula de compostos pel procediment Ellman

MOSTRA	CARACTERÍSTIQUES	PES	VOLUM dio	CONCENTRACIÓ
Tampó fosfat	NaHPO ₄ dissolt en milliq	6.6150g	500ml	1.323%
	NaH ₂ PO ₄ dissolt en milliq	0.5392g	500ml	0.10784%
HA-sh 200kda (0.75%)	Mostra a avaluar	0.0028g	400 µl	0.7%
HA-sh 200kda (0.5%)	Mostra a avaluar	0.0019g	400 µl	0.475%
HA (1.5%)	Mostra a avaluar	0.0027g	200 µl	1.35%
HA (0.5%)	Mostra a avaluar	0.0013g	200 µl	0.65%
L-CYSTEINE	Recta patró	0.0911g	5 ml	1.822%
Reactiu Ellman	Indicador	0.0063g	20 ml	0.315%

v. Caracterització de grups S-S: Amb reactiu d'Ellman.

Per determinar els grups disulfur que tenim, hem de preparar mostres d'HA i d'HA-SH en concentracions del 1,5% i del 3%, és a dir, en total tindrem quatre mostres diferents, dues per cada tipus d'àcid hialurònic. Farem un volum de 200 µl per cada mostra, per tant haurem de tenir una mostra de 0.003g pels dos àcids, modificat i no modificat, i una mostra de 0.006g pels dos àcid també. Per tant, posarem 200 µl de solució tampó fosfat a cada vial i hi posarem les mostres en estat sòlid dels àcids. Després posarem 100 µl de NaBH₄ al 2% de concentració, en prepararem 8 ml per tant necessitarem 0.16g NaBH₄ en estat sòlid.

Un cop hem posat els àcids i el NaBH₄ hem de deixar 30 minuts les vials a 40°C fent "shaking". Acabat aquest temps, afegim 60 µl d'àcid clorhídric (HCl) i ho barregem durant dos minuts més. Després hi posem 200 µl d'acetona i barregem tres minuts, afegim 40 µl de tampó fosfat i comprovem que el pH sigui el correcte: pH 8. Per últim afegirem el reactiu d'Ellman el qual l'hem de posar en una concentració de 0.3 mg/ml, fem 10 ml per tant haurem de pesar 0.003 g, el valor real en el meu cas és de 0.0031g, ho barregem amb tampó fosfat i afegim la mateixa quantitat de volum que hem afegit fins ara, d'aquesta solució és a dir: 200µl+100µl+60µl+200µl+40µl=600µl del reactiu d'Ellman.

Taula 3.3: Taula de dades dels compostos per la caracterització dels grups disulfur

MOSTRA	CARACTERÍSTIQUES	PES	VOLUM dio	CONCENTRACIÓ
TAMPÓ BICARBONAT	Na ₂ CO ₃ dissolt en aigua milliq	0.8402g	100ml	0.8402%
ADH (PATRÓ)	Recta patró en tampó	0.0065g	1ml	0.65%
HA (mostra)	Mostra a avaluar	0.00065g	100 µl	0.65%
ADH (mostra)	Mostra a avaluar	0.0018g	100 µl	1.80%

b. Síntesi de hidrogels

En primer lloc preparem l'àcid hialurònic, que serà el component principal dels hidrogels. Posteriorment, la lacasa, la qual és un enzim que pertany al grup de les oxidases del coure blau i que prové d'algunes plantes i fongs. I per últim, caldrà afegir diversos materials fenòlics, que s'oxidaran mitjançant l'acció de la lacasa i serviran de agent de "cross-link" per a la formació de l'hidrogel, d'aquesta manera serà possible determinar si poden aportar propietats diferents a les que té un hidrogel convencional.

i. Preparació dels àcids hialurònics

Per formar els hidrogels, en la primera prova farem servir dos tipus d'àcid hialurònic, un d'ells serà l'àcid hialurònic sense modificar (HA) i l'altre serà l'àcid hialurònic modificat amb grups tiol. Es farà servir l'HA sense modificar per produir les mostres control de l'experiment amb la intenció de veure si un cop acabat el procés, les mostres gelifiquen amb els dos àcids o només gelifica amb l'àcid modificat en qüestió (HA-SH). En el cas de que les mostres gelifiquin, el seu comportament hauria de deixar de ser el d'un fluid i s'hauria de comportar com un sòlid. Les expectatives, són que, en el cas de l'àcid hialurònic sense modificar no s'aprecii un canvi en l'estat de la matèria (de fluid a sòlid), o que almenys no hi hagi tant de canvi com en el cas de les mostres amb àcid hialurònic modificat amb grups tiol (HA-SH). En aquest últim cas sí que esperem un canvi d'estat de la matèria després de fer el procés de gelificació. En el cas de que només l'àcid modificat gelifiqui, es demostraria que el responsable d'aquest fet és el grup tiol, convertint-lo en un component molt important en la formació d'hidrogels, i per tant, de tot el projecte.

Els dos àcids seran diluïts en una concentració de l'1,5% i en farem 5 ml de cadascun d'ells:

HA \Rightarrow 0,0749g

HA-SH \Rightarrow 0,0750g

Aquests àcids seran barrejats també amb compostos fenòlics per poder fer proves sobre les propietats dels mateixos un cop formin part de l'hidrogel.

ii. Preparació de la lacasa

Per produir hidrogels necessitem la lacasa per oxidar els compostos fenòlics que s'afegiran. La seva funció principal és la d'oxidar un substrat i la reducció de l'oxigen molecular a aigua a través d'un mecanisme de transferència d'un electró.

Aquest enzim pot oxidar substrats com compostos fenòlics i altres subtrats biològics amb potencials redox inferiors a 1.

A més, una de les seves altres funcions és la de la degradació de la lignina i la eliminació de compostos fenòlics tòxics que es produeixen durant el procés.

Per preparar-la es seguiran els següents passos:

Diluir les càpsules de lacasa en aigua MilliQ a una concentració de 20 mg/ml, produïm 5 ml de lacasa de manera que necessitem 100 mg de càpsules de lacasa. Posteriorment sotmetrem el fluid a vòrtex durant 2- 3 minuts amb la intenció de dissoldre les càpsules i alliberar la lacasa del seu interior. Acte seguit posarem el tub falcon a la centrifugadora durant 5 minuts a 3000 revolucions per minut, aquest procés farà que les restes de les càpsules quedin al fons del tub mentre que l'enzim lacasa quedarà en suspensió. Es recuperarà el sobrenedant per a utilitzar l'enzim.

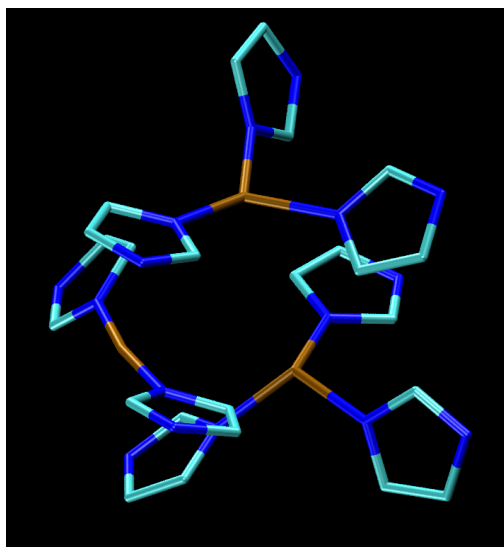


Figura 3.6: Estructura molecular de l'enzim lacasa

iii. Preparació dels compostos fenòlics

Els compostos fenòlics són molècules orgàniques, que posseeixen en la seva estructura almenys un grup fenol, és a dir, un anell aromàtic enllaçat amb un grup hidroxil. Molts d'ells són considerats metabòlits secundaris de les plantes, que es produeixen principalment a través de dues vies: La ruta de l'àcid shikímic i la via de l'àcid manòlic. Per aquest motiu, els compostos fenòlics estan considerats metabòlics heterogenis⁵

Els compostos fenòlics utilitzats durant aquest treball son: Àcid elàgic, àcid chicòric, àcid clorogènic, àcid catequínic i rutina. Aquests compostos fenòlics seran preparats en una concentració de 12,5 milimolar per a fer-los servir com a agent de cross-link en la seva forma oxidada i a més per veure quines repercussions o propietats aportaran a l'hidrogel.

Al intentar dissoldre l'àcid el·làgic i la rutina en aigua MilliQ, observem que aquests no són solubles en aigua, de manera que s'ha de dissoldre aquests compostes en altres dissolvents. En primer lloc, dissoldrem l'àcid el·làgic en DMSO, que és un dissolvent orgànic molt potent, per tant, farem la dissolució dins d'una campana extractora de seguretat. Posteriorment, caldrà dissoldre el compost fenòlic en una dissolució tampó rutinfosfat amb un pH de 7,4. Les quantitats de materials fenòlics han estat calculades per dissoldre's en un volum de 5 ml.

Taula 3.4: Taula de masses per la preparació dels compostos fenòlics

Fenòlics	Ellagic acid	Chlorogenic acid	Chicoric acid	Rutin	Catechin Hydrate
Pes calculat	0,0190g	0,0222g	0,0296g	0,0382g	0,0181g
Pes real	0,0189g	0,0221g	0,0294g	0,0385g	0,0180g

A partir de la solució de 12,5 milimolar del Chlorogenic acid farem dues solucions més de concentracions inferiors de 10 i 7,5 milimolar a través de dilucions.

iv. Formació d'hidrogels amb compostos fenòlics

Per la formació dels hidrogels es farà servir àcid hialurònic (HA) com a mostra control i àcid hialurònic modificat amb grups tiol (HA-SH). Aleshores, en una zona de la placa es posen 400 μ l d'HA per pou i a una altra zona de la placa es posen 400 μ l d'HA-SH per pou. Posteriorment, es fa el mateix procés pels dos àcids, s'afegeixen 50 μ l de cada compost fenòlic preparat prèviament. Posteriorment, s'afegirà 50 μ l a cada pou de l'enzim lacasa i barrejarem en cada cas amb una xeringa diferent absorbint i expulsant el fluïd. Per últim, posarem la placa de petri a una incubadora a 34 graus centígrads durant dues hores, i un cop acabat aquest temps, s'observarà el nou comportament dels fluïds.



Figura 3.7: Placa de petri de 24 pous

c. Caracterització de hidrogels amb compostos fenòlics

Un cop tenim les mostres d'hidrogels preparades, podem començar a fer proves per determinar si els compostos fenòlics que s'han utilitzat per a la formació dels hidrogels poden aportar noves propietats als hidrogels. Entre les propietats que poden aportar aquest compostos fenòlics son antimicrobianes o antioxidant, entre altres. .

Dels fenòlics que hem preparat, hem escollit 3 d'ells perquè són els que posseeixen les propietats més interessants en termes d'estructura i funció biològica. Per tant, les proves les farem principalment amb els compostos de àcid catequina, àcid elàgic i rutina. En primer lloc agafarem mostres de cadascun dels fenòlics a provar, per tant pesarem 9 mostres de 30 miligrams per cada compost.

. Resultats dels hidrogels amb compostos fenòlics

Els pous que contenien àcid hialurònic sense modificar, al cap de dues hores no havien gelificat, fet que confirma que els grups tiol són necessaris per la formació d'hidrogels.

Per l'altra banda, els pous amb àcid hialurònic modificat amb grups tiol van gelificar ràpidament, en 3 minuts ja havien canviat d'estat a sòlid. És un canvi més ràpid del que esperàvem ja que esperava aquest resultat al cap de dues hores.

A continuació s'exposen fotografies del resultat. La gelificació es deu a que al oxidar-se els compostos fenòlics per l'acció de la lacasa, es formen quinones reactives que reaccionen amb els grups tiols mitjançant base de Schiff i addició de Michael. ¹⁰ Això forma una xarxa polimèrica que dona lloc a l'hidrogel. Pel mateix motiu l'HA sense modificat no forma hidrogels, perquè els grups fenòlics oxidats no poden reaccionar amb ell.

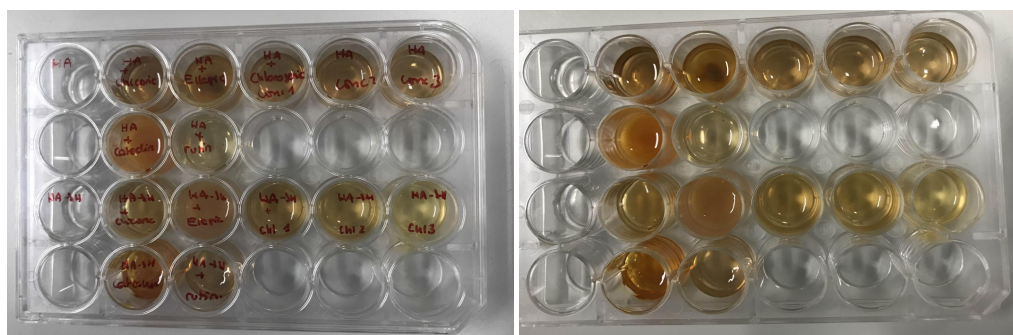


Figura 3.8: Placa de petri de 24 pous amb hidrogels formats amb compostos fenòlics

ii. Activitat antioxidant dels hidrogels: Assaig de DPPH

Per la prova de la oxidació del medi comptarem amb el DPPH, el qual prepararem dissolent 3 miligrams de DPPH en 100 mililitres de metanol.

El 2,2-difenil-1-picril·hidrazil (DPPH) és una pols cristal·lina de color fosc, en forma de radical lliure estable. Aquest compost té una aplicació al laboratori, la qual és un monitor d'entorns antioxidants.¹¹

Aquesta solució tindrà un color inicial de tonalitat lila, i si el medi en què es troba és antioxidant, el líquid es tornarà de color groc o ataronjat. L'assaig es basa en exposar un agent antioxidant, en aquest cas els hidrogels sotmesos a prova, al DPPH. Agafarem 12 eppendorfs dels quals 9 tindran mostres dels hidrogels amb compostos fenòlics (3 de cada) i els afegirem 1

200 µL de DPPH, també als tubs sense hidrogel que serviran com a control negatiu (C-), i s'incubaran durant 30 minuts en foscor. Després de la incubació, el contingut dels eppendorfs es transvasarà a la placa grenier i es medirà la longitud d'ona de les solucions a 517 nm. Un cop obtinguts els valors d'absorbància es calcularan amb la formula següent:

$$\text{Activitat antioxidant (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs (M)}}{\text{Abs (C-)}} \right) \right] \cdot 100$$

On Abs(M) és l'absorbància de la mostra problema i l'Abs (C-) és l'absorbància del control negatiu.

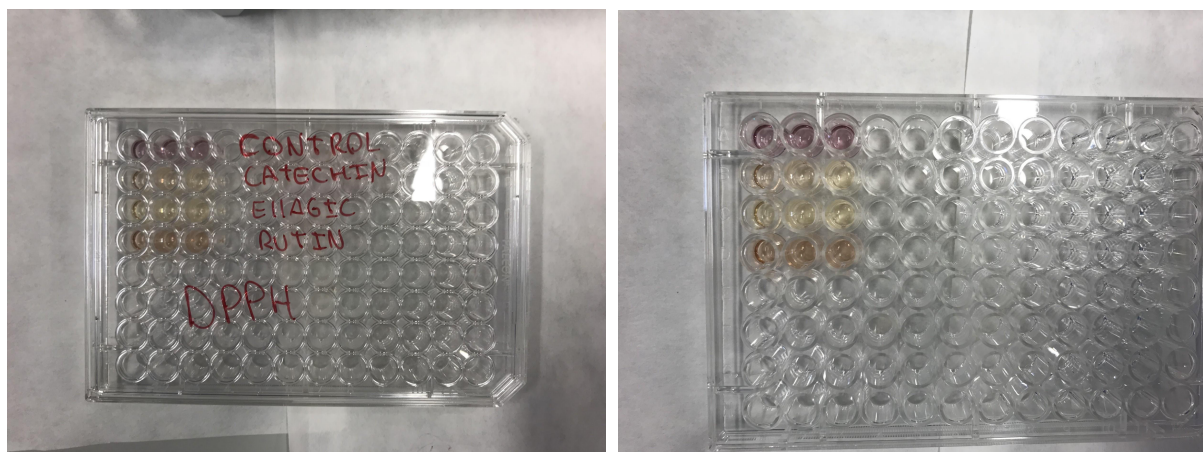


Figura 3.9: Placa amb la prova de control d'oxidació del medi

ii. Prova de la degradació del polímer

Per realitzar la prova de la degradació dels hidrogels, procedirem fent servir els tres hidrogels amb compostos fenòlics que hem fet servir fins ara, d'aquests hidrogels en pesarem dues mostres de cadascun de 60 mg i cadascuna d'elles la posarem en un eppendorf al qual hi afegirem 1 ml d'àcid gàlic. En primer lloc, prepararem el reactiu de Folin i ciocalteu, i ho farem barrejant 1 ml d'aquest compost en 9 ml d'aigua MilliQ. Aquest compost és transparent, i la seva funció és quantificar els grups fenòlics alliberats durant la degradació del hidrogel.¹²

Els hidrogels en PBS es van incubar durant 24 hores, i es va agafar mostres en diferents temps. A més, en un altre tub els hidrogels es van tractar amb hialuronidasa, un enzim que degrada l'àcid hialurònic i aquest valor es va considerar com el 100 % d'alliberació de grups fenòlics. Aquestes mostres es traspassen a una placa nunc.

En la placa es van analitzar les mostres recollides a diferents temps, la de degradació total i una recta de calibrat feta amb l'àcid gàlic, el compost fenòlic més comú. En cada pou es va ficar 20 µL de mostra, 100 µL de bicarbonat de calci i 80 µL del reactiu de Folin i Ciocalteu. Un cop tenim aquesta placa disposada, podem posar-la al lector i aleshores llegir les dades a 765 nm.

iii. Control de creixement de microorganismes

En aquest punt farem el control de creixement de microorganismes, pel qual necessitarem un medi líquid Muller-Hinton (MHB) que és un medi de cultiu d'ampli espectre no diferencial.

Per a mantenir les condicions d'esterilitat, treballarem sota la flama d'un cremador Bunsen. En primer lloc agafarem la punta d'una pipeta micromètrica i amb aquesta tocarem una colònia de *P.aeruginosa* i llençarem la punta a un tub falcon on hi hem posat el MHB autoclavat.

Al cap d'un dia incubant sota agitació a 37° centígrads veurem que el medi ja no és transparent, ara és turbit, indicant el creixement bacterià. Posteriorment, farem unes dilucions de bacteris a una densitat òptica de 0.01, i posarem en diversos tubs eppendorfs les mostres dels tres hidrogels amb compostos fenòlics. En aquests tubs el medi amb els bacteris i deixarem dos tubs més, un amb bacteris sense hidrogels i l'altre estèril com a controls positius (C+) i negatius (C-). Mesurarem l'absorbància a 600 nm i incubarem durant 24 hores. Al dia següent, mesurarem un altre cop l'absorbància de totes les mostres per a extrapolar el creixement bacterià. El valor d'absorbància de cada pou s'obté restant el valor inicial al valor final després de les 24 hores. El valor de creixement de les mostres es calcularà amb la següent equació:

$$\% \text{ de creixement} = \frac{Abs(M) - Abs(C-)}{Abs(C+) - Abs(C-)} \cdot 100$$

On l'Abs(M) és l'absorbància de la mostra control, Abs(C+) la del control de creixement i l'Abs(C-) la del control negatiu.

iv. Viabilitat cel·lular

Per a aquest experiment, treballarem dins d'una campana de flux laminar de bio-seguretat nivell 2 per a mantenir l'esterilitat de les cèl·lules. Per realitzar l'experiment de la viabilitat cel·lular contarem amb una placa cossiar black en la qual tenim, dos tipus de cèl·lules: fibroblasts, de la línia cel·lular BJ5T α i queratinòcits de la línia cel·lular Hacat.



Figura 3.10: Placa Cossiar black

Les cèl·lules epitelials presents a la placa estan vives, per tant, se'ls ha de posar medi i aquest s'ha de canviar cada dia. El primer dia canviem el medi dels pous i deixant una fila de cada tipus de cèl·lules sense medi, perquè morin i les farem servir com a control negatiu (C-). Els pous on hi ha cèl·lules es fiquen en contacte amb els nostres hidrogels, i per a cada línia es deixaran pous sense tractament per a fer el control de creixement (C+). Les plaques es porten al incubador a 37 i amb un 5 % de CO₂ durant 24 hores. Al dia següent, es retiren els hidrogels i el medi, i s'omplen els pous amb 100 μ L de medi fresc i es retorna la placa a l'incubador. Per últim a les 24 hores es retira el medi i es fa una solució del reactiu alamarBlue 1/10 amb medi, i es fica 100 μ L a cada pou.

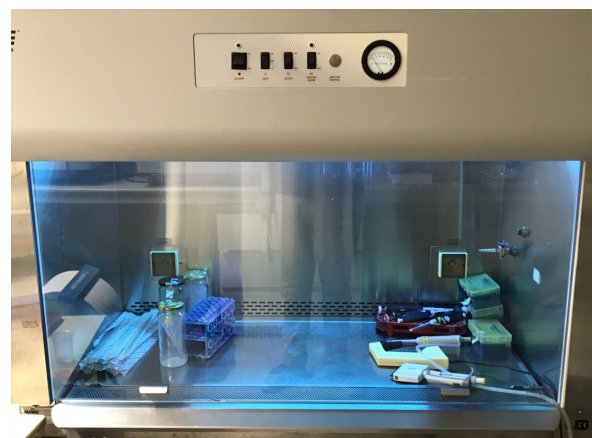


Figura 3.11: Campana de flux laminar de bio-seguretat nivell 2

L'AlamarBlue és un reactiu per fer experiments de viabilitat cel·lular que no és tòxic i conté un indicador de color blau permeable¹³. Aquest indicador rep el nom de resazurina, el qual experimenta un canvi colorimètric en resposta a la reducció metabòlica cel·lular. Això fa que es determini la quantitat de respiració de les cèl·lules, i per tant la seva viabilitat, a partir del canvi colorimètric que experimenta aquest compost cap a un color rosat fluorescent.

A les 4 hores es llegeix la fluorescència del reactiu excitant a una longitud d'ona de 550 nm i llegint a 590 nm. La viabilitat de les cèl·lules es calcularà amb la fórmula següent:

$$\% \text{ de viabilitat} = \frac{Flu(M) - Flu(C-)}{Flu(C+) - Flu(C-)}$$

On Flu(M) és la fluorescència de la mostra control, Flu(C+) la del control de creixement i Flu(C-) la del control negatiu.

i. Tractament de dades colorimètriques amb recta patró

La majoria de resultats que tenim són dades preses per lectures fotòniques, per tant són mètodes colorimètrics.

Per a quantificar la concentració d'un compost utilitzant els mètodes colorimètrics seguirem els següents passos:

- Preparació d'una recta de calibrat utilitzant un banc de dilucions d'un compost a una concentració coneguda.
- Subtracció dels valors del control blanc a totes les mostres patró i problema.
- Representació dels valors de la recta patró i obtenció de l'equació de la recta.
- Extrapolació de les mostres problema utilitzant la recta de calibrat.
- Obtenció de la concentració real utilitzant el factor de dilució.

4. Resultats i discussió

a. Avaluació de grups amino: Mètode TNBSA

Un cop s'ha llegit la placa i s'obté la recta de calibrat a partir de les solucions d'ADH la qual és la següent:

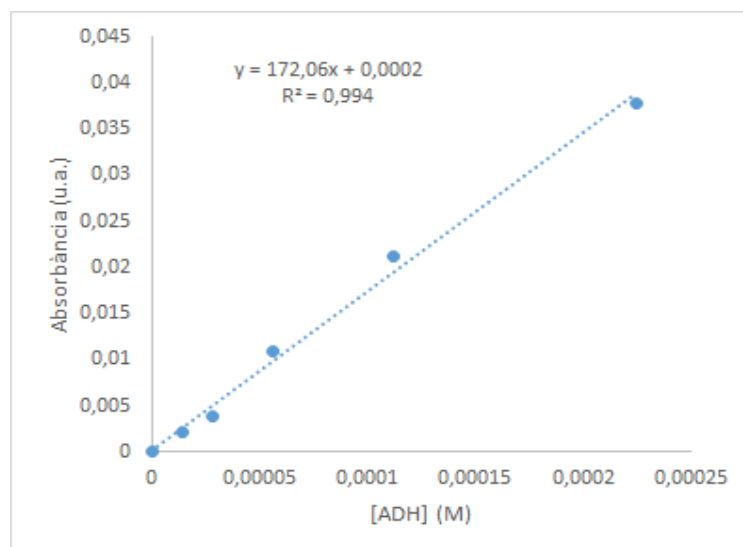


Figura 4.1: Recta de calibrat del procediment TNBSA

Amb la recta de calibrat es determinen els paràmetres de la recta de regressió on $A=172.06$ i $B=0.0002$ (Figura 4.1). A partir de la recta de calibrat s'extrapola els valors de les mostres i s'obté que el polímer HA-ADH presenta 840 μmol de grups amino (NH_2) per cada gram de polímer.

b. Avaluació de grups tiol: Procediment Ellman

Primer hem obtingut la recta patró de concentració de grups tiols utilitzant un banc de dilucions de L-cisteïna.

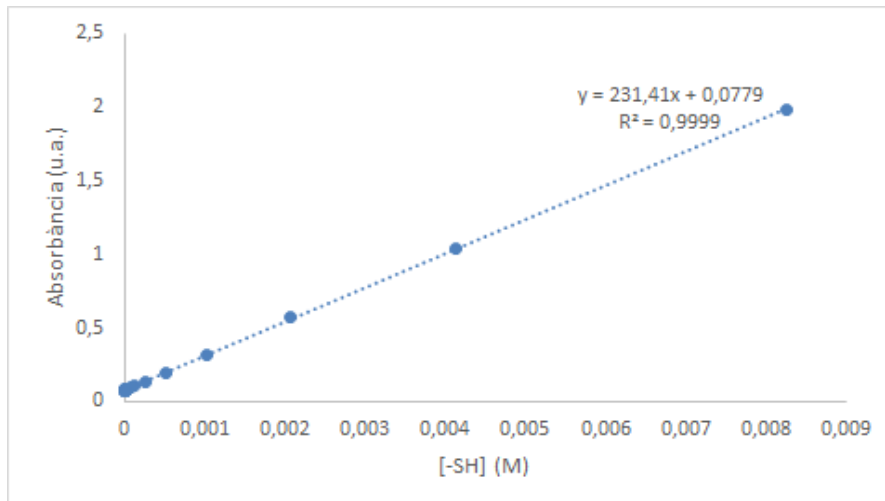


Figura 4.2: Recta de calibrat pel procediment Ellman

A partir d'aquesta equació (Figura 4.2), hem extrapolat la quantitat de grups tiols present en les mostres, que és de 67 μmol de SH/g de polímer HA-SH.

c. Avaluació de grups disulfur: Amb el reactiu d'Ellman

Un cop acabada la lectura de la placa a 412 nm, es farà servir la mateixa recta de calibrat que en l'apartat anterior, ja que les mostres van ser extretes de les mateixes solucions, per tant es seguirà comptant amb la recta de calibrat que s'ha obtingut pel mètode de quantificació colorimètric que s'ha explicat anteriorment, ja que les dues proves s'han realitzat amb mostres d'origen comú. (Figura 4.2)

De manera que es conserven les mateixes dades per als valors de les constants A i B de la recta de calibrat. Repetint el procediment anterior extrapolarem els valors dels grups tiols totals. Resultat 222 $\mu\text{mol/g}$.

d. Resultats dels hidrogels amb compostos fenòlics

Els pous que contenien àcid hialurònic sense modificar, al cap de dues hores no havien gelificat, fet que confirma que els grups tiol són necessaris per la formació d'hidrogels.

Per l'altra banda, els pous amb àcid hialurònic modificat amb grups tiol van gelificar ràpidament, en 3 minuts ja havien canviat d'estat a sòlid. És un canvi més ràpid del que esperàvem ja que esperava aquest resultat al cap de dues hores.

A continuació s'exposen fotografies del resultat. La gelificació es deu a que al oxidar-se els compostos fenòlics per l'acció de la lacasa, es formen quinones reactives que reaccionen amb els grups tiols mitjançant base de Schiff i addició de Michaels.¹⁰ Això forma una red polimèrica que dona lloc a l'hidrogel. Pel mateix motiu l'HA sense modificat no forma hidrogels, perquè els grups fenòlics oxidats no poden reaccionar amb ell.

e. Caracterització de hidrogels amb compostos fenòlics

i. Activitat antioxidant dels hidrogels: Assaig de DPPH

Un cop hem posat la placa al lector, aquest ha llegit la placa amb una longitud d'ona de 517 nm i amb un marge d'error de 9 nm.

Amb aquestes dades hem de calcular el percentatge de la viabilitat antioxidant dels diferents materials que s'han posat a prova, i per fer-ho seguirem els següents passos: Calculem la mitjana d'absorbància de les mostres de control (les quals són només DPPH), la mitjana obtingut és de 0,23716667. Amb aquesta mitja es calcularà el percentatge de viabilitat antioxidant de cada mostra.

Tenint els percentatges de cada mostra només cal fer la mitjana i calcular l'error.

Utilitzant l'equació mostrada a materials i mètodes es pot calcular l'activitat antioxidant de 30 mg de cadascun dels hidrogels combinats amb compostos fenòlics.

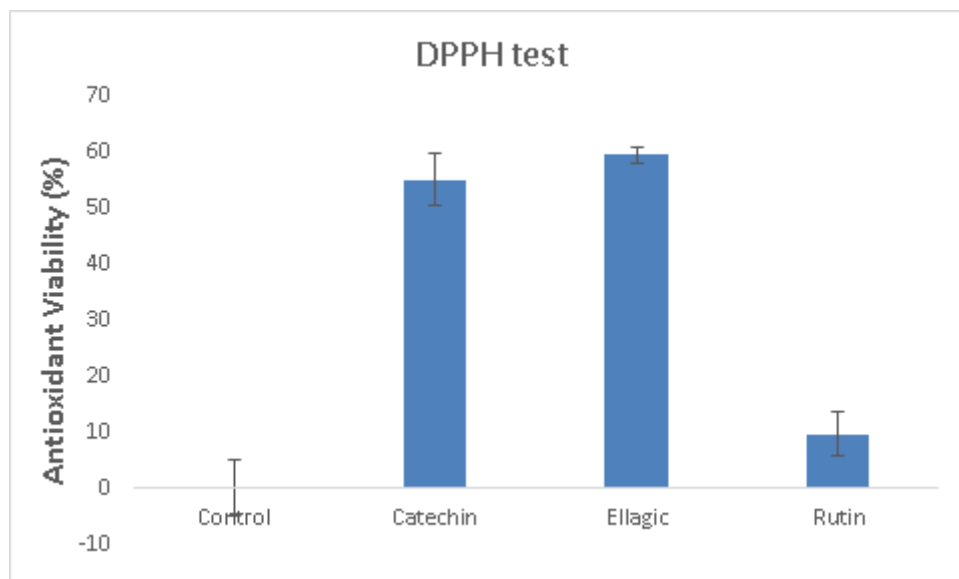


Figura 4.5: Gràfica comparativa entre els percentatges d'activitat antioxidant per la prova de medi antioxidant.

En aquest diagrama de barres es pot observar, que en la mostra control el DPPH no reacciona perquè no hi ha cap compost amb el que pugui reaccionar (Figura 4.5). També podem veure que en els tres casos dels hidrogels amb compostos fenòlics naturals, tenen acció antioxidant, tot i que en el cas del Rutin ens trobem amb una baixa activitat antioxidant, ja que es tracta d'una activitat antioxidant del 9.655%. Per altra banda tenim als altres dos compostos: l'àcid catequina i l'àcid ellàgic, que tenen una activitat antioxidant del voltant del 55% i 60%, molt més alta que la de la rutina. De totes maneres, el compost amb una capacitat antioxidant més alta és l'àcid ellàgic que supera a les altres mostres oferint a més, el marge d'error més petit dels tres compostos a comparar. Aquests resultats concorden amb l'esperat, ja que els compostos fenòlics s'han descrit com a forts agents antioxidants ¹⁴. En els materials amb aplicació oftalmològica, l'activitat antioxidant pot resultar molt interessant ja que el estrès oxidatiu provoca algunes patologies com la precipitació de proteïnes de les lents o anomalies microvasculars.

ii. Control de la degradació del polímer

Com en els casos anteriors hem utilitzat un calibrat, en aquest cas amb àcid gàlic, per obtenir la recta següent.

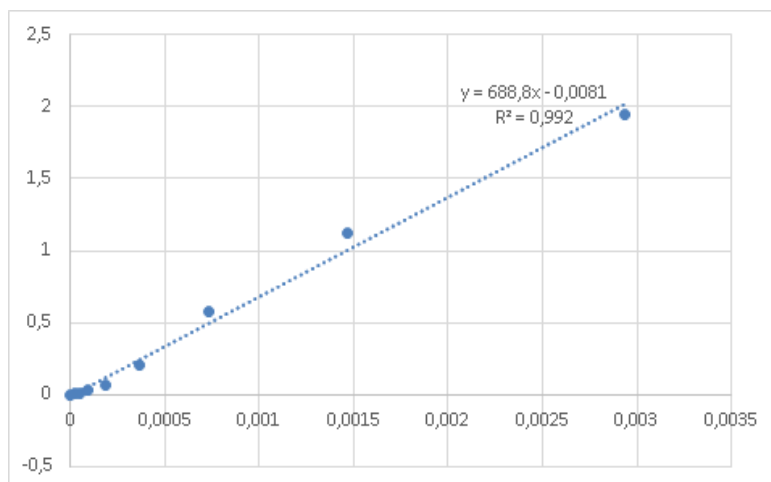


Figura 4.6: Recta de calibrat per la quantificació de compostos fenòlics

Amb aquesta recta de regressió extreta de les dades de les mostres control, hem obtingut una fórmula que ens indica la pendent que tenen les lectures, de manera que ara tenim les dues constants de la recta $A=688,87$ i $B=0,0081$ (Figura 4.6)

Amb aquestes dades podem quantificar la quantitat de fenols alliberats al medi, i per tant fer una estimació de la degradació de l'hidrogel.

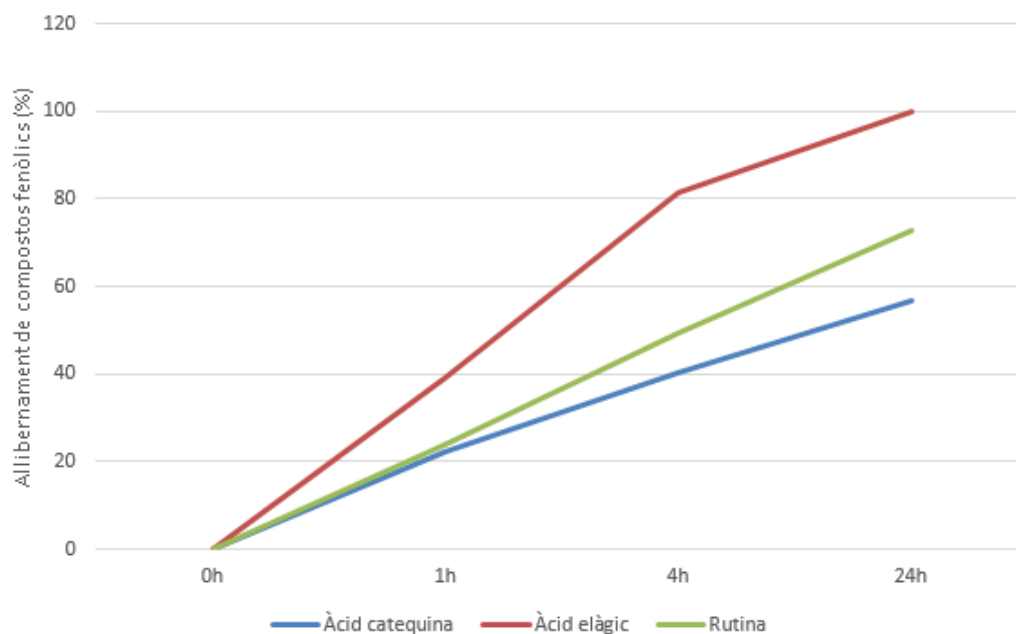


Figura 4.7: Gràfica de la degradació dels hidrogels amb compostos fenòlics en funció del temps d'exposició expressat en percentatge.

Finalment, obtenim la comparativa de degradació a través del temps entre els tres compostos fenòlics que s'han posat a prova. En primer lloc, ens trobem amb què el compost d'àcid elàgic ha tingut una degradació del 100% al cap de 24 hores.

Per als altres dos hidrogels, en el cas de l'hidrogel amb rutina, hi ha un alliberament de compost fenòlic major, que en el cas de l'hidrogel amb àcid elàgic, a més aquesta diferència creix a mesura que passa el temps (Figura 4.7)

Aquesta degradació en PBS indica que aquests hidrogels podrien ser uns bons vehicles per a encapsular i alliberar controladament fàrmacs oftalmològics.

iii. Control del creixement de microorganismes

En la bibliografia trobem exemples de com utilitzant compostos fenòlics oxidats per a formar hidrogels confereix al material activitat antimicrobiana. Com la finalitat d'aquests materials es l'ús oftalmològic, els hidrogels es van provar per la seva capacitat que puguin tenir contra *P. aeruginosa*, un dels patògens més importants en aquest camp (Mercado, P., Llenque, L., & Trujillo, M. (2014))

A partir dels resultats del l'absorbància en els microorganismes en medi líquid que hem mesurat anteriorment, i fent servir la fórmula esmentada anteriorment es pot obtenir la figura següent:

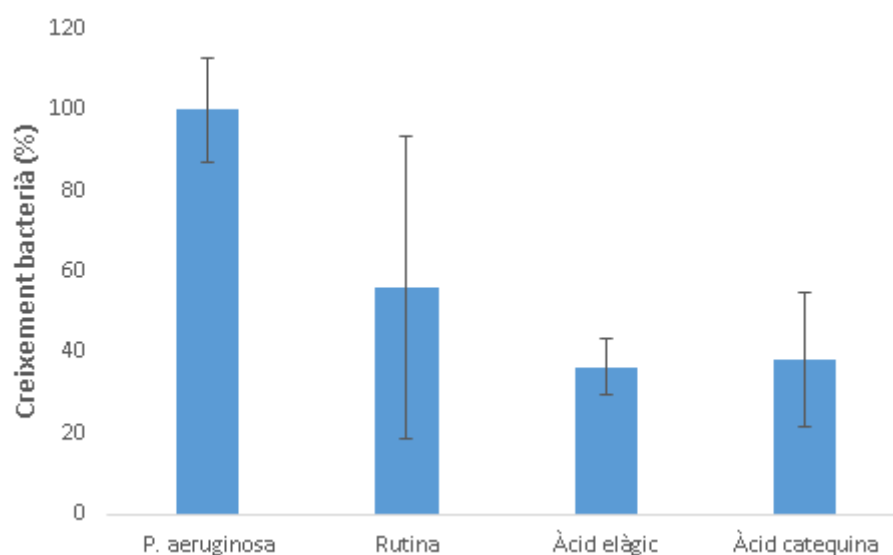


Figura 4.8: Gràfica del creixement de microorganismes (*P.aeruginosa*) comparant l'exposició dels bacteris a hidrogels amb compostos fenòlics respecte el creixement normal del bacteri.

En aquesta gràfica es pot observar quin és el creixement de la *Pseudomona aeruginosa*, i per l'altra banda es pot determinar que aquest bacteri no s'ha desenvolupat tan bé amb l'exposició a hidrogels amb compostos fenòlics. Aquest fet demostra que, l'àcid elàgic i la catequina poden inhibir parcialment el creixement bacterià. En el cas de l'àcid elàgic es pot relacionar el ràpid alliberament del compost, amb la capacitat inhibidora que presenta l'hidrogel del creixement bacterià. Per l'altra banda, la rutina ha presentat una variabilitat molt alta en aquest assaig pel que no es pot afirmar la seva activitat com en el cas dels altres dos compostos (Figura 4.8)

iv. Viabilitat cel·lular

La finalitat d'aquest estudi és la producció de materials per a ús oftalmològic, per tant, aquests materials han de ser innocus per a les persones. El primer pas per a això és avaluar la toxicitat dels hidrogels sobre cèl·lules humanes. Per a fer-ho comptem amb dos tipus de cèl·lules epitelials diferents, per una banda els fibroblasts i per l'altra els queratinòcits.

Després de ficar en contacte les cèl·lules amb els hidrogels durant 24 h, les cèl·lules es van sotmetre al assaig d'alarblue, que canvia de color al reduir-se degut al metabolisme cel·lular. En primer lloc s'ha de determinar el valor de fluorescència mitjà per les mostres de control negatiu i positiu per cadascuna de les cèl·lules, i com s'ha concretat anteriorment, el control positiu és atribuït a les cèl·lules vives amb medi mentre que al control negatiu s'atribueixen les cèl·lules mortes.

A partir d'aquests valors es pot calcular el percentatge de viabilitat de les cèl·lules exposades als hidrogels amb la fórmula esmentada en materials i mètodes.

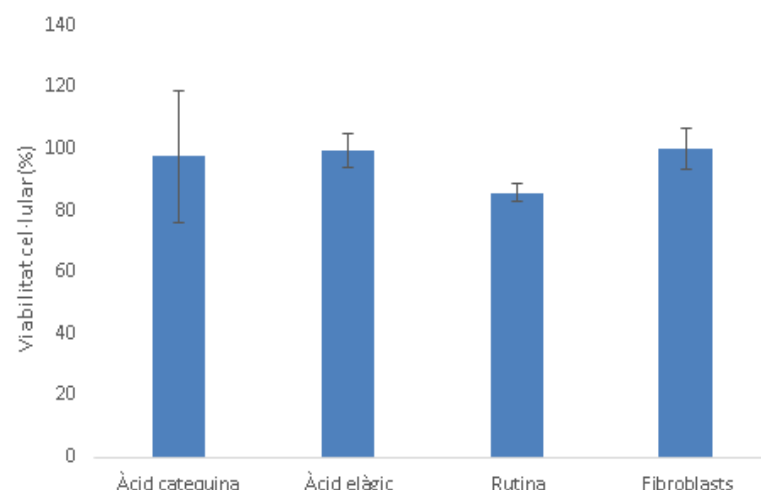


Figura 4.9: Gràfica de percentatges de viabilitat cel·lular en cèl·lules epitelials (fibroblasts) exposades a hidrogels amb compostos fenòlics

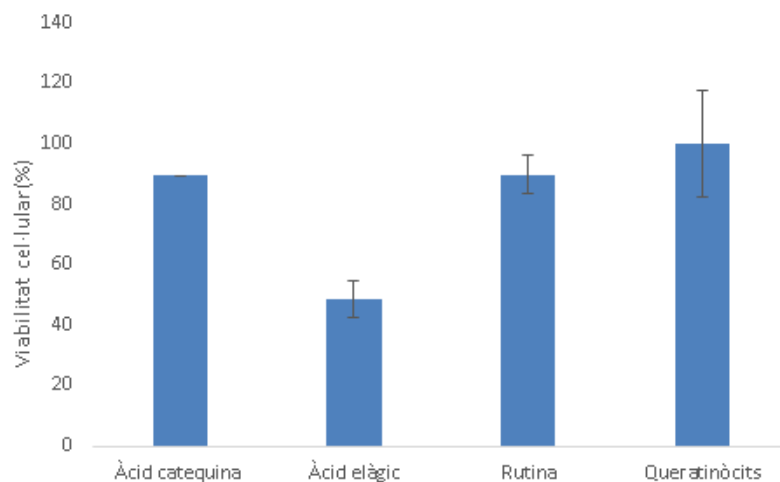


Figura 4.10: Gràfica de percentatges de viabilitat cel·lular en cèl·lules epitelials (fibroblasts) exposades a hidrogels amb compostos fenòlics

En aquesta gràfica es pot observar com els hidrogels de àcid catequina i rutina no presenten toxicitat contra les cèl·lules epitelials, mantenint una viabilitat d'almenys el 80% que es considera un bon valor de compatibilitat. L'únic hidrogel que presenta toxicitat és àcid elàgic i només front a queratinòcits, front fibroblast presenta una gran biocompatibilitat (Figura 4.9 i Figura 4.10)

5. Conclusions

En aquest treball s'ha treballat amb àcid hialurònic i s'ha fet la modificació d'aquest polímer amb el grup funcional tiol i s'ha caracteritzat de manera que s'ha pogut observar el nivell de reacció amb els grups tiol amb un resultat de 67 μmol de SH/g en el polímer HA-SH. Posteriorment s'ha pogut dur a terme la síntesi de diversos hidrogels a partir de l'àcid modificat esmentat anteriorment, amb la intervenció de l'enzim lacasa, combinant els hidrogels resultants amb diversos compostos fenòlics, dels quals se n'ha pogut estudiar les propietats que aquests aportaven a l'hidrogel com poden ser la seva velocitat de degradació, la seva biocompatibilitat i la seva capacitat antioxidant i el control de creixement dels microorganismes.

En primer lloc, a l'assaig de la propietat antioxidant dels compostos fenòlics, s'ha observat que el compost amb menys activitat d'aquest tipus és la rutina ja que quasi no arriba al 10% d'activitat antioxidant, mentre que en el cas dels àcids catequina i elàgic, superen el 50%, per tant la rutina no seria una bona opció per una aplicació de caràcter antioxidant. En segon lloc, el resultat de l'àcid elàgic a l'assaig per determinar la seva degradació és d'un 100% al cap de 24h, mentre que la rutina i l'àcid catequina no han arribat al 100% de degradació, per tant al cap de 24h encara hi ha compost fenòlic dins dels hidrogels que contenen rutina i àcid catequina. En el cas del control de creixement dels organismes, el resultat de marge d'error que cal tenir en compte en el cas del compost rutina és massa elevat, de manera que no el tindrem en compte. D'altra banda els dos compostos restants tenen més o menys el mateix comportament ja que en els dos casos inhibeixen el creixement de microorganismes entre un 60% i un 70%. Per últim, en el cas de la biocompatibilitat, els tres compostos fenòlics han suposat un decreixement de la viabilitat de màxim un 20% (en el cas de la rutina), per tant aquests compostos són biocompatibles amb les cèl·lules epitelials dels fibroblasts. Per l'altra banda, en el cas dels queratinòcits, aquests han tingut una major reducció en la seva viabilitat ja que mentre l'exposició a la rutina i a l'àcid catequina no han fet créixer la viabilitat de les cèl·lules més d'un 20 %, l'àcid elàgic ha provocat un decreixement de més del 50% de la viabilitat dels queratinòcits, fet que el converteix en un fenòlic no compatible amb els fibroblasts.

Per tant, un dels objectius principals que era la síntesi de hidrogels per la oxidació del substrat amb la lacasa, s'ha assolit. Per l'altra banda, l'objectiu de produir l'assaig

d'aquest hidrogel com a plataforma pel subministrament dels fàrmacs no realitzat per falta de temps al laboratori, de manera que s'haurà de seguir estudiant per poder-lo testar en futurs treballs.

6. Bibliografia

- (1) Katime, I. A.; A. K., T.; Amashta, I. Materiales Inteligentes: Hidrogeles Macromoleculares. Algunas Aplicaciones Biomédicas. *Real Soc. española Química* **2005**, 4, 35–50.
- (2) Stefanov, I.; Pérez-Rafael, S.; Hoyo, J.; Cailloux, J.; Santana, O. O.; Hinojosa-caballero, D.; Tzanov, T. Multifunctional Enzymatically Generated Hydrogels for Chronic Wound Application. *Biomacromolecules* **2017**, 18, 1544–1555.
- (3) West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F., & K. Angiogenesis Induced by Degradation Products of Hyaluronic Acid. *Scien* **1985**, 228, 1324–1326.
- (4) Goa, K. L.; Benfield, P.; Alpar, J.; Luke, S.; Pini, G.; Dougados, M.; Rhumatologie, C. De; Cochin, H.; Fraser, J. R. E. A Review of Its Pharmacology and Use as a Surgical Aid in Ophthalmology , and Its Therapeutic Potential in Joint Disease and Wound Healing Hyaluronic Acid. *Drugs* **1994**, 47, 536–566.
- (5) Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 152–159.
- (6) Uresti, R. M.; Aldana, L. *Avances de Ciencia y Tecnología Alimentaria En México José Alberto Ramírez de León*; 2013.
- (7) Martínez, P. E. M.; Díaz, L. A. L.; Laguna, M. V. T. Sensibilidad de Pseudomonas Aeruginosa y Staphylococcus Aureus a Concentración de Aceite de Citrus Reticulata Variedad Satsuma “ Mandarina .” *Cienc. y Tecnol.* **2014**, 2, 61–71.
- (8) Farah, A.; Donangelo, C. M. Phenolic Compounds in Coffee 1. *Plant Phystool* **2006**, 18 (1), 23–36.
- (9) Kwang, S.; Kyu, J.; Tomimatsu, T.; Shimoboji, T. Synthesis and Degradation Test of Hyaluronic Acid Hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, 40, 374–380.
- (10) Stefanov, I.; Pérez-rafael, S.; Hoyo, J.; Cailloux, J.; Santana, O. O. Multifunctional Enzymatically-Generated Hydrogels for Chronic Wound Application. 1–4.
- (11) Garcia, E. J.; Alencar, S. M. De; Reis, A.; Loguercio, A. D.; Helena, R.; Grande, M. Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to Be Applied on Bleached Teeth. *Braz. Dent. J.* **2012**, 23, 22–27.

- (12) Calle, N. G. EXPRESIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE ORIGEN EUCARIOTA, 2017, Vol. 1.
- (13) Brien, J. O.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, È. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Biochem* **2000**, 1, 5421–5426.
- (14) Dinte, E.; Vostinaru, O.; Samoila, O.; Sevastre, B.; Bodoki, E. Ophthalmic Nanosystems with Antioxidants for the Prevention and Treatment of Eye Diseases. *Coatings* **2020**, 10–36.